

# ALPHA-GLYCOSYL NARINGIN, PRODUCTION THEREOF AND USE THEREOF

**Publication number:** JP4013691 (A)

**Publication date:** 1992-01-17

**Inventor(s):** YONEYAMA MASARU; MIYAKE TOSHIO

**Applicant(s):** HAYASHIBARA BIOCHEM LAB

**Classification:**

**- international:** A23L1/03; A23L1/06; A23L1/23; A23L1/302; A23L2/44; A23L2/52; A23L2/56; A23L3/3436; A23L3/3562; A61K8/00; A61K8/60; A61K31/70; A61K31/7042; A61K31/7048; A61P3/02; A61Q17/04; A61Q19/00; A61Q19/02; C07H17/07; C12N9/24; C12P19/14; C12P19/18; C12P19/60; A61K38/00; A23L1/03; A23L1/06; A23L1/226; A23L1/302; A23L2/42; A23L2/52; A23L3/34; A23L3/3463; A61K8/00; A61K8/30; A61K31/70; A61K31/7042; A61P3/00; A61Q17/04; A61Q19/00; A61Q19/02; C07H17/00; C12N9/24; C12P19/00; A61K38/00; (IPC1-7): C07H17/07

**- European:** C12P19/60B; A23L1/302; A61K8/60A; A61Q19/00; C07H17/07; C12N9/24; C12P19/14

**Application number:** JP19900112665 19900429

**Priority number(s):** JP19900112665 19900429

**Also published as:**

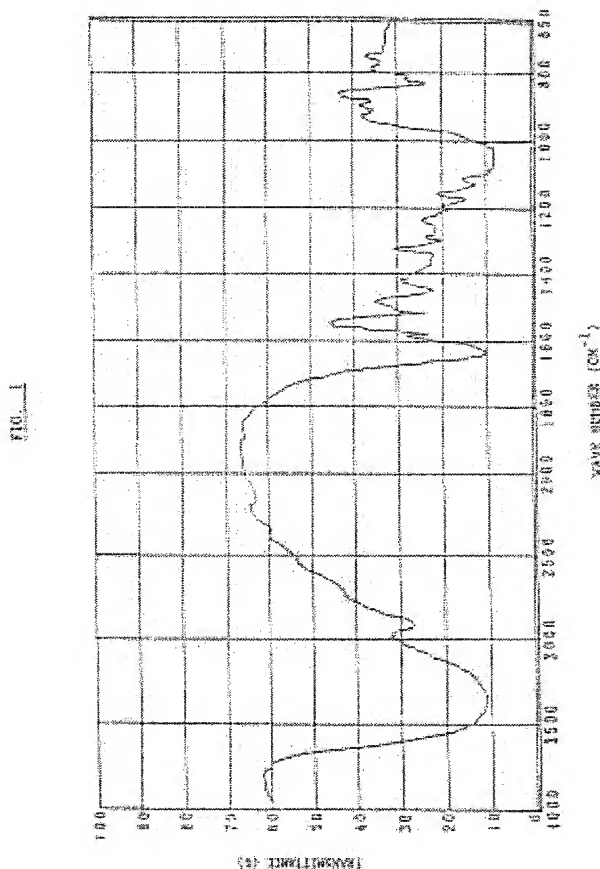
JP3060232 (B2)  
EP0455432 (A1)  
EP0455432 (B1)  
KR100203759 (B1)  
DE69117795 (T2)

more >>

## Abstract of JP 4013691 (A)

**NEW MATERIAL:** A naringin compound having equimolar or more D-glucose residues bonded through alpha-bonding. **USE:** A diet such as a beverage or a processed food, a protective or remedy for sensitive diseases and a cosmetic such as a skin cream or a whitening cream.

**PREPARATION:** A glucosyltransferase (e.g. cyclomaltodextrin glucanotransferase) is acted on a solution containing naringin and an alpha-glucosyl sugar compound to synthesize (alpha-glycosyl naringin and the resultant solution is then brought into contact with a synthetic porous adsorbent for purification.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A)

平4-13691

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)1月17日

C 07 H 17/07  
 A 23 L 1/03  
     1/302  
     3/3436  
 A 61 K 7/00  
     7/42  
     31/70  
 C 12 N 9/24  
 C 12 P 19/60

ADK

F

7822-4C  
 6977-4B  
 8114-4B  
 6977-4B  
 9051-4C  
 7252-4C  
 9164-4C  
 7823-4B  
 8214-4B  
 2121-4B

A 23 L 1/06

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全13頁)

⑭ 発明の名称  $\alpha$ -グリコシル ナリンジンとその製造方法並びに用途

⑯ 特 願 平2-112665

⑰ 出 願 平2(1990)4月29日

⑱ 発 明 者 米 山 勝 岡山県総社市黒尾617番地の1  
 ⑱ 発 明 者 三 宅 俊 雄 岡山県岡山市伊島町1丁目3番23号  
 ⑲ 出 願 人 株式会社林原生物化学 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号  
 研究所

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

$\alpha$ -グリコシル ナリンジンとその製造方法並びに用途

## 2. 特許請求の範囲

- (1) ナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジン。
- (2) ナリンジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させて $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成せしめ、これを採取することを特徴とする $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの製造方法。
- (3) ナリンジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させて $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成せしめ、次いで、この溶液を多孔性合成吸着剤に接触させて精製し、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを採取することを特徴とする $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの製造方法。

(4) ナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを含有せしめた飲食物。

(5) ナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを有効成分として含有せしめた抗感受性疾患剤。

(6) ナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを有効成分として含有せしめた化粧品。

## 3. 発明の詳細な説明

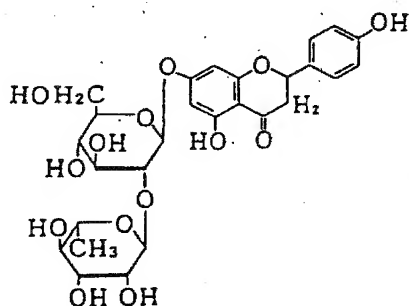
## 〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンとその製造方法並びに用途に関し、更に詳細には、ナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジン、および、ナリンジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させて新規 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成せしめ、これを採取することを特徴とする $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの製造方法、並びに、この方法で得られる $\alpha$ -

グリコシル ナリンジンを含有せしめることを特徴とする飲料、加工食品などの飲食物、感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤などの化粧品などに関する。

〔従来の技術〕

ナリンジンは、次に示す化学構造を有し、毛細血管の強化、出血予防、血圧調整などの生理作用を持つビタミンPとして、また、苦味剤として古くから知られ、食品、医薬品、化粧品などに利用されている。



ナリンジンの化学構造

しかしながら、ナリンジンは水に難溶で、室温25℃では1Lの水にわずか1g程度(約0.1V/V%)しか溶けず、使用上困難を極めている。

〔発明が解決しようとする課題〕

従来のナリンジンの欠点を解消し、水溶性に優れ、苦味を維持し、毒性の懸念もなく、加えて、生体内で生理活性を充分発揮しうるナリンジン誘導体の実現が強く望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、上記欠点を解消するためになされたものであって、とりわけ、生化学的手法を利用して、新規ナリンジン誘導体を目指して鋭意研究した。

その結果、ナリンジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に糖転移酵素を作用させることにより、水溶性に優れ、苦味を維持し、毒性の懸念もなく、生体内で容易に加水分解され、ナリンジン本来の生理活性を発揮しうる新規 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの生成しうることを見出し、その製造方法並びに飲食物、感受性疾患の予防剤、

ビタミンPは、生体内で、ビタミンCの生理活性、例えば、生体結合組織の主成分であるコラーゲンの合成に必要なプロリンやリジンのヒドロキシ化反応に関与し、また、例えば、チトクロームCの $Fe^{+++}$ を還元して $Fe^{++}$ にするなどの酸化還元反応に関与し、更には、白血球増加による免疫増強作用に関与するなどを増強することが知られており、生体の健康維持、増進に重要な役割をなしている。

ナリンジンの用途は、単に栄養素としてのビタミンP強化剤にとどまらず、その化学構造、生理作用から、単独または他のビタミンなどと併用して、例えば、苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物などに、また、ウィルス性疾患、細菌性疾患、循環器疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤すなわち抗感受性疾患剤に、更には、安定剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、メラニン生成抑制剤などの美肌剤、色白剤などとして化粧品にまで及び、その範囲は極めて広い。

治療剤、化粧品などへの用途を確立して本発明を完成した。

また、この糖転移反応により生成した $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを精製するに際しては、その反応溶液と多孔性合成吸着剤とを接触させ、その吸着性の違いを利用することにより、容易に精製できることも見出し本発明を完成した。

従って、本発明の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの製造方法は、従来技術の欠点を一挙に解消し、その工業化の実現を極めて容易にするものである。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いるナリンジンは、高度に精製されたナリンジンに限る必要はなく、ナリンジンと、例えば、シトロニン、ヘスペリジン、ルチンなどのフラボノイド配糖体との混合物、更には、ナリンジンを含有している各種植物由来の抽出物、またはその部分精製物などが適宜使用できる。

植物組織としては、例えば、柑橘類の果実、果皮、未熟果などが有利に利用できる。

本発明に用いる $\alpha$ -グルコシル糖化合物は、同

時に用いる糖転移酵素によってナリンジンから $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成することのできるものであればよく、例えば、アミロース、デキストリン、シクロデキストリン、マルトオリゴ糖などの澱粉部分加水分解物、更には、液化澱粉、糊化澱粉などが適宜選ばれる。

従って、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの生成を容易にするためには、糖転移酵素に好適な $\alpha$ -グルコシル糖化合物が選ばれる。

例えば、糖転移酵素として、 $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)を用いる際には、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオースなどのマルトオリゴ糖、またはDE約10乃至70の澱粉部分加水分解物などが好適であり、シクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)を用いる際には、シクロデキストリンまたはDE1以下の澱粉糊化物からDE約60の澱粉部分加水分解物などが好適であり、 $\alpha$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.1)を用いる際には、DE1以下の澱粉糊化物からDE約30のデキストリン、澱粉部

分加水分解物などが好適である。

また、反応時の $\alpha$ -グルコシル糖化合物濃度は、ナリンジンに対して約0.5乃至100倍、望ましくは、約2乃至20倍の範囲が好適である。

反応時のナリンジン含有液は、ナリンジンをしてきただけ高濃度に含有するものが望ましく、例えば、ナリンジンを、懸濁状で、または、高温で溶解させた、もしくはpH7.0を超えるアルカリ側pHで溶解させた溶液状で高濃度に含有する溶液が適しており、その濃度は約1V/V%以上の高濃度、望ましくは、約2乃至20.0V/V%含有している溶液を意味する。

本発明に用いる糖転移酵素は、ナリンジンとこの酵素に好適な性質の $\alpha$ -グルコシル糖化合物とを含有する溶液に作用させる時、ナリンジンを分解せずに $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成するものであればよい。

例えば、 $\alpha$ -グルコシダーゼは、ブタの肝臓、ソバの種子などの動植物組織由来の酵素、または、ムコール(Mucor)属、ペニシリウム(Penicilli

um)属などに属するカビ、またはサッカロミセス(Saccharomyces)属などに属する酵母などの微生物を栄養培地で培養し得られる培養物由来の酵素が、シクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼは、バチルス(Bacillus)属、クレブシーラ(Klebsiella)属などに属する細菌培養物由来の酵素が、 $\alpha$ -アミラーゼは、バチルス属などに属する細菌、または、アスペルギルス(Aspergillus)属などに属するカビ培養物由来の酵素などが適宜選択できる。

これらの糖転移酵素は、前記の条件を満足しさえすれば、必ずしも精製して使用する必要はなく、通常は、粗酵素で本発明の目的を達成することができる。

必要ならば、公知の各種方法で精製して使用してもよい。また、市販の糖転移酵素を利用することもできる。

使用酵素量と反応時間とは、密接な関係があり、通常は、経済性の点から約5乃至80時間で反応を終了するように酵素量が選ばれる。

また、固定化された糖転移酵素をバッチ式で繰り返し、または連続式で反応に利用することも適宜選択できる。

また、反応溶液中のナリンジンの分解を防ぐために、反応はできるだけ遮光、嫌気下、微酸性条件で行なうのが望ましい。

このようにして $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成せしめた反応溶液は、そのまま $\alpha$ -グリコシル ナリンジン製品にすることもできる。通常は、反応溶液を濾過、濃縮してシラップ状の、更には、乾燥、粉末化して粉末状の $\alpha$ -グリコシル ナリンジン製品にする。

本製品は、ビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品などの用途に有利に利用できる。

更に、精製された $\alpha$ -グリコシル ナリンジン製品を製造する場合には、多孔性合成吸着剤によ

る吸着性の差を利用して $\alpha$ -グリコシル ナリンジンと $\alpha$ -グルコシル糖化合物などの夾雑物とを分離して精製すればよい。

本発明でいう多孔性合成樹脂とは、多孔性で広い吸着表面積を有し、かつ非イオン性のスチレン-ジビニルベンゼン重合体、フェノール-ホルマリン樹脂、アクリレート樹脂、メタアクリレート樹脂などの合成樹脂であり、例えば、市販されているRohm & Haas社製造の商品名アンバーライトXAD-1、アンバーライトXAD-2、アンバーライトXAD-4、アンバーライトXAD-7、アンバーライトXAD-8、アンバーライトXAD-11、アンバーライトXAD-12、三菱化成工業株式会社製造の商品名ダイヤイオンHP-10、ダイヤイオンHP-20、ダイヤイオンHP-30、ダイヤイオンHP-40、ダイヤイオンHP-50、IMACTI社製造の商品名イマクティSyn-42、イマクティSyn-44、イマクティSyn-46などがある。

本発明の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを生成せ

水、エタノール水などを通液すれば、まず、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンが溶出し、通液量を増すか有機溶媒濃度を高めるかすれば未反応ナリンジンが溶出してくる。

この $\alpha$ -グリコシル ナリンジン高含有溶出液を蒸留処理して、まず有機溶媒を溜去した後、適当な濃度にまで濃縮すれば $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを主成分とするシラップ状製品が得られる。更に、これを乾燥し粉末化することによって、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを主成分とする粉末状製品が得られる。

この有機溶媒による $\alpha$ -グリコシル ナリンジンおよび未反応ナリンジンの溶出操作は、同時に、多孔性合成吸着剤の再生操作にもなるので、この多孔性合成吸着剤の繰り返し使用を可能にする。

また、本発明の多孔性合成吸着剤による精製は、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物、水溶性糖類だけでなく、水溶性の塩類などの夾雑物も同時に除去できる特長を有している。このようにして得られる $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、次の特長を有している。

しめた反応液の精製方法は、反応液を、例えば、多孔性合成吸着剤を充填したカラムに通液すると、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンおよび比較的少量の未反応ナリンジンが多孔性合成吸着剤に吸着するのに対し、多量に共存する $\alpha$ -グルコシル糖化合物、水溶性糖類は吸着されことなくそのまま流出する。

必要ならば、糖転移酵素反応終了後、多孔性合成吸着剤に接触させるまでの間に、例えば、反応液を加熱して生じる不溶物を濾過して除去したり、ケイ酸アルミン酸マグネシウム、アルミン酸マグネシウムなどで処理して反応液中の蛋白性物質などを吸着除去したり、イオン交換樹脂(H型およびOH型)などで処理して脱塩するなどの精製方法を組み合わせて利用することも随意である。

前述のようにして、多孔性合成吸着剤カラムに選択的に吸着した $\alpha$ -グリコシル ナリンジンと比較的少量の未反応ナリンジンとは、希アルカリ、水などで洗浄した後、比較的少量の有機溶媒または有機溶媒と水との混合液、例えば、メタノール

- (1) ナリンジンと比較して $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、水溶性が極めて大きい。
- (2) ナリンジンと比較して $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、耐光性、安定性が大きい。
- (3)  $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、ナリンジンと実質的に同等の苦味を有する。
- (4)  $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、体内の酵素によりナリンジンとグルコースとに加水分解され、ナリンジン本来の生理活性(ビタミンP)を示す。また、ビタミンCとの併用により、それらの持つ生理活性を増強させることができる。
- (5)  $\alpha$ -グルコシル糖化合物を含有する製品の場合には、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの効果を発揮するのみならず、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物が賦形、増量効果や、甘味効果を発揮することができ、また、 $\alpha$ -グルコシル糖化合物を除去した精製製品の場合には、ほとんど賦形、増量することなく $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの効果を発揮することができる。

これらの特長から、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジ

ンは安全性の高い天然型のビタミンP強化剤としてばかりでなく、苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、ウィルス性疾患、細菌性疾患、循環器疾患、悪性腫瘍など感受性疾患の予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤など化粧品、更には、プラスチック製品などに有利に利用することができる。

また $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの呈味は、酸味、塩から味、渋味、旨味などを呈する各種物質ともよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、普通一般の飲食物、嗜好物、例えば、調味料、和菓子、洋菓子、氷菓、飲料、スプレッド、ペースト、漬物、ビン缶詰、畜肉加工品、魚肉・水産加工品、乳・卵加工品、野菜加工品、果実加工品、穀類加工品、など広範に利用することができる。とりわけ、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンが呈する苦味を柑橘類、ココア、コーヒー、チョコレート、茶類、生薬類へ、または、これらのフレーバー類へ付与して各種飲食物の風味改善を行なうことも

好都合である。また、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンをステビオシド、 $\alpha$ -グリコシル ステビオシド、レバウデイオシドA、グリチルリチン、 $\alpha$ -グリコシル グリチルリチン、ジヒドロカルコン類など植物由来の甘味料、グリシン、アラニン、L-アスパラチル フェニルアラニンメチルエステルなどアミノ酸系甘味料、シュクロース、水飴、砂糖結合水飴、ブドウ糖、異性化糖、フラクトース、蜂蜜、マルトース、ソルビトール、マルチトール、ラクトースなど糖類甘味料などから選ばれる甘味料の一種または二種以上と併用して呈味改善、風味向上などの目的で利用することも有利に実施できる。また、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンが、果汁中のフラボノイド化合物の晶出、沈殿を阻害するので、果汁飲料、果汁入りゼリーなどのにがり防止剤、曇防止剤などとして利用することも有利に実施できる。更に、家畜、家禽、蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などにビタミンP強化剤、嗜好性向上などの目的で配合して利用することも好都合である。

その他、タバコ、トローチ、肝油ドロップ、複合ビタミン剤、口中清涼剤、口中香錠、うがい薬、経管栄養剤、生薬、内服薬、注射剤、練歯みがき、口紅、リップクリーム、日焼け止めなど各種固状、ペースト状、液状の嗜好物、感受性疾患の予防剤、治療剤、すなわち、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤などの化粧品などに配合して利用することも有利に実施でき、更には、紫外線吸収剤、劣化防止剤などとしてプラスチック製品などに配合して利用することも有利に実施できる。

また、本発明でいう感受性疾患とは、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンによって予防され若しくは治療される疾患であり、それが、例えば、ウィルス性疾患、細菌性疾患、外傷性疾患、免疫疾患、リウマチ、糖尿病、循環器疾患、悪性腫瘍などであってもよい。 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの感受性疾患予防剤、治療剤は、その目的に応じてその形状を自由に選択できる。例えば、噴霧剤、点眼剤、点鼻剤、うがい剤、注射剤などの液剤、軟膏、はっふ剤、クリームのようなペースト剤、

粉剤、顆粒、カプセル剤、錠剤などの固剤などである。製剤に当たっては、必要に応じて、他の成分、例えば、治療剤、生理活性物質、抗生物質、補助剤、増量剤、安定剤、着色剤、着香剤などの1種または2種以上と併用することも随意である。

投与量は、含量、投与経路、投与頻度などによって適宜調節することができる。通常、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンとして、成人1日当たり、約0.001乃至10.0グラムの範囲が好適である。

また、化粧品の場合も、大体、前述の予防剤、治療剤に準じて利用することができる。

$\alpha$ -グリコシル ナリンジンを利用する方法としては、それらの製品が完成するまでの工程で、例えば、混和、混捏、溶解、浸漬、浸透、散布、塗布、噴霧、注入など公知の方法が適宜選ばれる。

以下、本発明の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの一例を実験で説明する。

#### 実験 1 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの調製

##### (1) 糖転移反応

ナリンジン1重量部およびデキストリン(DE 2

0) 6重量部に水50重量部を加えて加熱溶解し、これにバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼ (株式会社林原生物化学研究所販売) をデキストリングラム当たり20単位加え、pH6.0、70℃に維持して18時間反応させ、その後、加熱失活させ、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン含有液を得た。

## (2) 精製

(1)の方法で得た反応液を濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイアイオンHP-10(三菱化成工業株式会社販売)を充填したカラムにSV2で通液した。このカラムを水で洗浄後、50V/V%エタノールを通液し、この溶出液を濃縮して溶媒を溜去し、粉末化して淡黄色の $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[I]を原料のナリンジン重量に対して約130%の収率で得た。

## (3) アミラーゼによる加水分解

(2)の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[I]を水に1V/V%に溶解し、これにグルコア

ミラーゼ(EC 3.2.1.3、生化学工業株式会社販売)を該標品グラム当たり100単位加え、pH5.0、55℃に維持して5時間反応させた。反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイアイオンHP-10(三菱化成工業株式会社販売)のカラムにSV2で通液した。その結果、溶液中の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンと未反応ナリンジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、グルコース、塩類などは吸着することなく流出した。次いで、カラムを水で通液、洗浄した後、エタノール水溶液濃度を段階的に高めながら通液し、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン画分を採取し、減圧濃縮し、粉末化して、淡黄色の $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[II]を固形物当たり原料のナリンジン重量に対して約70%の収率で得た。

また、グルコアミラーゼに代えて、 $\beta$ -アミラーゼ(EC 3.2.1.2)、(生化学工業株式会社販売)を用いて、前述の方法に準じて、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[I]を加水分解し、精

製、濃縮、粉末化して、淡黄色の $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[III]を原料のナリンジン重量に対して約70%の収率で得た。

## 実験2 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの理化学的性質

### (1) 水溶性の向上

実験1(1)の方法で糖転移反応し調製した $\alpha$ -グリコシル ナリンジン含有液と、この方法で用いる酵素を予め加熱失活させて実験1(1)の方法に準じて処理した対照液とを、4℃の冷室に2日間放置したところ、対照液では、ナリンジンが析出して白濁したのに対し、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン含有液は透明のままであった。

従って、糖転移反応により生成した $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、水溶性が著しく向上している。

### (2) 溶剤に対する溶解性

$\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品は、水、0.1規定カセイソーダ、0.1規定塩酸に易溶、メタノール、エタノール微溶、エーテル、ベンゼン、クロ

ロホルムに不溶。

### (3) 呈味

ナリンジン、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[I]、標品[II]および標品[III]をそれぞれ1mM水溶液とし、その呈味を比較したところ、標品[I]、標品[II]および標品[III]は、いずれも、原料ナリンジンの苦味をよく維持し、原料ナリンジンの場合とほぼ同等の苦味を示すことが判明した。

### (4) 紫外線吸収スペクトル

$\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品の水溶液(pH6.0)を用いて紫外線吸収スペクトルを調べたところ、標品[I]、標品[II]および標品[III]のいずれも、ナリンジンの場合と同様に、吸収の強さの順に211nm、282nmおよび329nm付近に吸収極大を有していた。

### (5) 赤外線吸収スペクトル

KBr錠剤法によって、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品の赤外線吸収スペクトルを調べた。 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[II]の結果を

第1図に示す。対照としてナリンジンの結果を第2図に示す。

(6) 加水分解に対する安定性

- (a)  $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品は、ブタの肝臓由来の $\alpha$ -グルコシダーゼ(EC 3.2.1.20)により加水分解され、ナリンジンとD-グルコースとを生成する。
- (b)  $\beta$ -グルコシダーゼによっては加水分解されない。

(7) 薄層クロマトグラフィー

(a) 分析方法

プレート：メルク社製、

商品名ギーゼルゲル60 F<sub>254</sub>

展開溶媒：酢酸エチル：蟻酸：水=11:2:3

発色剤：10V/W%硫酸水溶液

(b) 分析結果

$\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品を分析したところ、標品[I]の場合には、Rf0.79のナリンジンのスポット以外に、新たに、Rf0.68、0.49、0.38、0.21などとともに原点まで数個のスポッ

トが認められ、標品[II]の場合には、Rf0.68のスポットが認められ、標品[III]の場合には、Rf0.68、0.49のスポットが認められた。

以上の理化学的性質から、標品[I]、標品[II]および標品[III]に含まれるRf0.68を示す物質は、ナリンジン1モルにD-グルコース残基が1モル $\alpha$ 結合した $\alpha$ -グリコシル ナリンジンと判断され、標品[I]および標品[III]に含まれるRf0.49を示す物質は、ナリンジン1モルにD-グルコースが2モル $\alpha$ 結合した $\alpha$ -マルトシル ナリンジンと判断され、同様に、標品[I]に含まれるRf0.38以下の複数のスポットを示す物質は、ナリンジン1モルにD-グルコース残基が3モル以上 $\alpha$ 結合した $\alpha$ -マルトオリゴシル ナリンジンであると判断される。

このように、本願発明の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンはナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合した水溶性良好な新規ナリンジン糖誘導体であって、生体内に摂取されると、 $\alpha$ -グルコシダーゼによって容易に加水分

解され、ナリンジン本来の生理活性を発揮する。

実験 3 急性毒性

7周令のdd系マウスを使用して、実験1(2)の方法で調製した $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[I]を経口投与して急性毒性テストをしたところ、5gまで死亡例は見られず、これ以上の投与は困難であった。

従って、本物質の毒性は極めて低い。なお、実験1(3)の方法で調製した $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[II]を用いて本テストを行ったところ、同様の結果を得、毒性の極めて低いことが判明した。

以下、本発明の実施例として、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの製造例を実施例Aで、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの用途例を実施例Bで述べる。

実施例 A-1  $\alpha$ -グリコシル ナリンジン

ナリンジン1重量部およびデキストリン(DE10)4重量部を水10重量部に加熱溶解し、75℃に冷却後直ちにパチルス・ステアロサーモフィルス由来のシクロマルトデキストリン グルカノ

トランスフェラーゼ(株式会社林原生物化学研究所販売)をデキストリングラム当たり20単位加え、pH5.5、75℃に維持し攪拌しつつ24時間反応させた。反応液を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、ナリンジンの約65%が、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン、 $\alpha$ -マルトシル ナリンジン、 $\alpha$ -マルトトリオシル ナリンジン、 $\alpha$ -マルトテトラオシル ナリンジン、などの $\alpha$ -グリコシル ナリンジンに転換していた。反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を、常法に従って、イオン交換樹脂(H型およびOH型)で脱塩精製し、濃縮してシラップ状の $\alpha$ -グリコシル糖化合物を含有する $\alpha$ -グリコシル ナリンジン製品を、固形物当たり原料重量に対して約85%の収率で得た。

本品は、ビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品など



の用途に有利に利用できる。

#### 実施例 A-2 α-グルコシル ナリンジン

実施例 A-1 の方法に準じて調製したシラップ状の α-グルコシル糖化合物を含有する α-グリコシル ナリンジン製品1重量部を水4重量部に溶解し、これにグルコアミラーゼ(EC 3.2.1.3、生化学工業株式会社販売)を α-グリコシル ナリンジン製品固形物グラム当たり100単位加え、50℃、5時間反応させた。反応液を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、α-グリコシル ナリンジンは、α-グルコシル ナリンジンに転換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し、濾液を多孔性合成吸着剤、商品名ダイヤイオン HP-10(三菱化成工業株式会社販売)のカラムに SV2 で通液した。その結果、溶液中の α-グルコシル ナリンジンと未反応ナリンジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、グルコース、塩類などは吸着することなく流出した。次いで、カラムを水で通液、洗浄した後、エタノール水溶液濃度

を段階的に高めながら通液し、α-グルコシル ナリンジン画分を採取し、減圧濃縮し、粉末化して、粉末状の α-グルコシル ナリンジンを固形物当たり原料のナリンジン重量に対して約55%の収率で得た。

α-グルコシル ナリンジンを酸で加水分解したところ、ナリンゲニン1モルに対し、L-ラムノース1モル、D-グルコース2モルを生成し、また、α-グルコシル ナリンジンに、ブタの肝臓から抽出し部分精製した α-グルコシダーゼを作用させると、ナリンジンと D-グルコースとに加水分解されることが判明した。

本 α-グルコシル ナリンジンは、高度に精製された水溶性の高いビタミン P 強化剤として、また、苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、抗感受性疾患剤、化粧品などに有利に利用できる。

#### 実施例 A-3 α-グリコシル ナリンジン

ナリンジン1重量部およびデキストリン(DE8)

10重量部を水20重量部に加熱溶解し、70℃に冷却し、これにシクロマルトデキストリン グルカノトランスフェラーゼをデキストリングラム当たり30単位加え、pH6.0、65℃に維持して攪拌しつつ40時間反応させた。

反応液を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、ナリンジンの約75%が α-グリコシル ナリンジンに転換していた。

反応液を加熱して酵素を失活させ、濾過し濾液を多孔性合成吸着剤、商品名アンバーライト XAD-7(Rohm & Haas社製造)のカラムに SV1.5 で通液した。

その結果、溶液中の α-グリコシル ナリンジンと未反応ナリンジンとが多孔性合成吸着剤に吸着し、デキストリン、オリゴ糖、塩類などは吸着することなく流出した。

このカラムを水で通液、洗浄した後、50V/V%メタノールを通液して、α-グリコシル ナリンジンおよびナリンジンを溶出し、これを濃縮し、粉末化して、粉末状 α-グリコシル ナリ

ンジン製品を原料のナリンジン重量に対して約10%の収率で得た。

本品は、水溶性の高いビタミン P 強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、化粧品、プラスチック製品などの用途に有利に利用できる。

#### 実施例 A-4 α-グリコシル ナリンジン

##### (1) α-グルコシダーゼ標品の調製

マルトース4V/V%、リン酸1カリウム0.1V/V%、硝酸アンモニウム0.1V/V%、硫酸マグネシウム0.05V/V%、塩化カリウム0.05V/V%、ポリペプトン0.2V/V%、炭酸カルシウム1V/V%(別に乾熱滅菌して植菌時に無菌的に添加)および水からなる液体培地500重量部にムコール・ジャバニカス(Hucor javanicus)IFO 4570を温度30℃で4時間振盪培養した。培養終了後、菌糸体を採取し、その湿菌糸体48重量部に対し、0.5M酢酸緩衝液(pH5.3)に溶解した4M尿素液500重量部

を加え、30℃で40時間静置した後、遠心分離した。この上清を流水中で一夜透析した後、硫酸0.9飽和とし、4℃で一夜放置して生成した塩析物を濾取し、0.01M酢酸緩衝液(pH5.3)50重量部に懸濁溶解した後、遠心分離して上清を採取し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ標品とした。

## (2) $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの調製

ナリンジン3重量部およびデキストリン(DE30)20重量部を水50重量部に加熱溶解し、55℃に冷却後直ちに(1)の方法で調製した $\alpha$ -グルコシダーゼ標品10重量部を加え、pH6.0に維持して攪拌しつつ55℃で40時間反応させた。

反応液を薄層ペーパークロマトグラフィーで分析したところ、ナリンジンの約50%が $\alpha$ -グリコシル ナリンジンに転換していた。

反応液を実施例A-3と同様に精製し、濃縮、粉末化して粉末状 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン製品を原料のナリンジン重量に対して約95%の収率で得た。

本品は、実施例A-3の場合と同様に、水溶

状の $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを含有する液で煮込んで、緑色の鮮かなフキの水煮を得た。

本品は、野趣に富んだ苦味を有しており、各種和風料理の材料としても好適である。

## 実施例 B-3 求 肥

モチ種澱粉1重量部に水1.2重量部を混合し、加熱糊化しつつ、これに砂糖1.5重量部、結晶性 $\beta$ -マルトース(林原株式会社製造、登録商標サンマルト)0.7重量部、水飴0.3重量部および実施例A-1の方法で得たシラップ状 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン0.02重量部を混和し、以後、常法に従って、成形、包装して求肥を製造した。

本品は、野趣に富んだほのかな苦味を有する風味で、口当たりも良好なきびだんご風の和菓子である。

## 実施例 B-4 混合甘味料

はちみつ100重量部、異性化糖50重量部、 $\alpha$ -グリコシル ステビオシド(東洋精糖株式会社製造、商品名  $\alpha$ -G スイート)1重量部および実施例A-4の方法で得た粉末状 $\alpha$ -グリ

性の高いビタミンP強化剤としてばかりでなく、安全性の高い天然型の苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤などとして、各種用途に利用できる。

## 実施例 B-1 ハードキャンディー

還元麦芽糖水飴(林原商事株式会社販売、登録商標マビット)1,500重量部を加熱し、減圧下で水分約2%以下になるまで濃縮し、これに実施例A-3の方法で得た粉末状 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン1重量部および適量のカラメル、コーヒー香料を混和し、次いで常法に従って、成形、包装してハードキャンディーを得た。

本品は、ビタミンPおよび苦味を強化したコーヒーキャンディーであって、低う蝕性、低カロリーである。

## 実施例 B-2 フキの水煮

フキを皮むきし、適当な長さに切断して、薄い食塩水に数時間浸し、これを $\alpha$ -グリコシル ルチンと青色1号とを配合して調製した緑色着色料および実施例A-1の方法で得たシラップ

コシル ナリンジン0.02重量部を混合して混合甘味料を得た。

本品はビタミンPを強化した味質良好な甘味料で、その甘味度は砂糖の約2倍で健康食品として好適である。

## 実施例 B-5 サンドクリーム

結晶性 $\alpha$ -マルトース(林原株式会社製造、登録商標ファイントース)1,200重量部、ショートニング1,000重量部、カカオマス50重量部、実施例A-3の方法で得た粉末状 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン3重量部およびレシチン1重量部を常法により混和してサンドクリームを製造した。

本品は、ビタミンPを強化し、苦味をきかせたチョコレート風味のサンドクリームで、口当たり、溶け具合とも良好である。

## 実施例 B-6 錠 剤

L-アスコルビン酸20重量部に結晶性 $\beta$ -マルトース13重量部、コーンスターチ4重量部および実施例A-2の方法で得た粉末状 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン3重量部を均一に混合した後、

直径12mm、20R杵を用いて、打錠し錠剤を得た。

本品は、L-アスコルビン酸と $\alpha$ -グルコシル ナリンジンとの複合ビタミン剤で、L-アスコルビン酸の安定性もよく、飲み易い錠剤である。

#### 実施例 B-7 カプセル剤

酢酸カルシウム・一水塩10重量部、L-乳酸マグネシウム・三水塩50重量部、マルトース57重量部、実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グルコシル ナリンジン20重量部及びエイコサペンタエン酸20%含有 $\gamma$ -シクロデキストリン包接化合物12重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒とした後、常法に従って、ゼラチンカプセルに封入して、一カプセル150mg入のカプセル剤を製造した。

本品は、血中コレステロール低下剤、免疫賦活剤、美肌剤などとして、感受性疾患の予防剤、治療剤、健康増進用食品などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-8 軟膏

与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、使用に際しての生理食塩水などへの溶解性は極めて良好である。

#### 実施例 B-10 注射剤

塩化ナトリウム6重量部、塩化カリウム0.3重量部、塩化カルシウム0.2重量部、乳酸ナトリウム3.1重量部、マルトース45重量部及び実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グルコシル ナリンジン1重量部を水1,000重量部に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を滅菌したプラスチック容器に250mLずつ充填して注射剤を製造した。

本品は、ビタミンP補給としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル補給のための注射剤で、病中、病後の治療促進、回復促進などに有利に利用できる。

#### 実施例 B-11 経管栄養剤

結晶性 $\alpha$ -マルトース20重量部、グリシン1.1重量部、グルタミン酸ナトリウム0.18重量部、食塩1.2重量部、クエン酸1重量部、乳酸カルシ

ウム4重量部をグリセリン10重量部と均一に混合し、この混合物を、ワセリン50重量部、木ロウ10重量部、ラノリン10重量部、ゴマ油14.5重量部、実施例A-4の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ナリンジン1重量部及びハッカ油0.5重量部の混合物に加えて、更に均一に混和して軟膏を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして、更には外傷、火傷の治療促進剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-9 注射剤

実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グルコシル ナリンジンを水に溶解し、常法に従って、精製濾過してバイロゲンフリーとし、この溶液を20mL容アンプルに $\alpha$ -グルコシル ナリンジン50mgになるように分注し、これを減圧乾燥し、封入して注射剤を製造した。

本注射剤は、単体で、または、他のビタミン、ミネラルなどと混合して筋肉内又は静脈内に投

与できる。また、本品は、低温貯蔵の必要もなく、使用に際しての生理食塩水などへの溶解性は極めて良好である。

本品は、ビタミンP補給としてだけでなく、カロリー補給、ミネラル補給のための注射剤で、病中、病後の治療促進、回復促進などに有利に利用できる。

#### 実施例 B-12 浴用剤

DL-乳酸ナトリウム21重量部、ビルビン酸ナトリウム8重量部、実施例A-1の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ナリンジン5重量部及びエタノール40重量部を、精製水26重量部及び着色料、香料の適量と混合し、浴用剤を製造した。

本品は、美肌剤、色白剤として好適であり、入浴用の湯に100乃至10,000倍に希釈して利用すればよい。本品は、入浴用の湯の場合と同様に、

洗顔用水、化粧水などに希釈して利用することも有利に実施できる。

#### 実施例 B-13 乳液

ポリオキシエチレンベヘニルエーテル0.5重量部、テトラオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール1重量部、親油型モノステアリン酸グリセリン1重量部、ビルビン酸0.5重量部、ベヘニルアルコール0.5重量部、アボガド油1重量部、実施例A-3の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ナリンジン1重量部、ビタミンE及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸ナトリウム1重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部、カルボキシビニルポリマー0.1重量部及び精製水85.3重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し乳液を製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### 実施例 B-14 クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコー

ル2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-2の方法で得た $\alpha$ -グリコシル ナリンジン2重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリル10重量部及び防腐剤の適量を、常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部及び精製水86重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合しクリームを製造した。

本品は、日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

#### [発明の効果]

本文で述べたごとく、本発明の新規物質であるナリンジンにD-グルコース残基が等モル以上 $\alpha$ 結合している $\alpha$ -グリコシル ナリンジンは、水溶性に優れ、苦味を有し、毒性の懸念もなく、生体内で容易にナリンジンとD-グルコースとに加水分解され、ナリンジン本来の生理活性を発揮する。

また、この $\alpha$ -グリコシル ナリンジンが、ナ

リンジンと $\alpha$ -グリコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素を作用させる生化学的手法により容易に生成できることより、経済性に優れ、その工業実施も容易である。

更に、ナリンジンの仕込濃度を高めて反応させることができ、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを容易に高濃度に生成しうることを見出し、併せて、この反応液の精製に際して、反応液を多孔性合成吸着剤と接触させて $\alpha$ -グリコシル ナリンジンを精製できることも見出したことにより、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの大量製造を極めて容易にするものである。

また、このようにして得られる $\alpha$ -グリコシル

ナリンジンは、水溶性良好、耐光性・安定性良好、十分な生理活性を発揮するなどの特徴を有しており、安全性の高い天然型のビタミンP強化剤としてばかりでなく、苦味剤、酸化防止剤、安定剤、品質改良剤、予防剤、治療剤、紫外線吸収剤、劣化防止剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、抗感受性疾患剤、美肌剤、色白剤など化粧

品、更には、プラスチック製品などに有利に利用される。

従って、本発明による $\alpha$ -グリコシル ナリンジンの工業的製造法とその用途の確立は、飲食品、化粧品、医薬品、プラスチック産業における工業的意義が極めて大きい。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の一例として、 $\alpha$ -グリコシル ナリンジン標品[II]の赤外線吸収スペクトル図を示す。

第2図は、対照として、ナリンジンの赤外線吸収スペクトル図を示す。

特許出願人

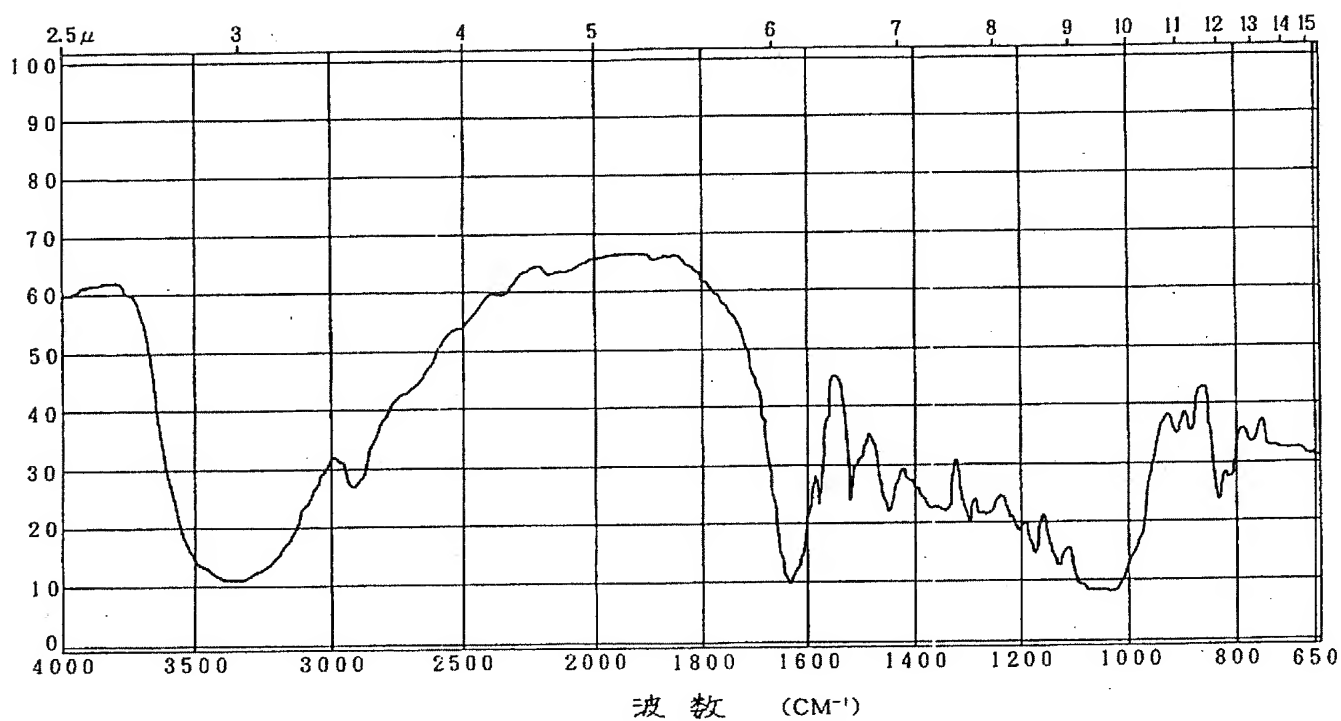
株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原

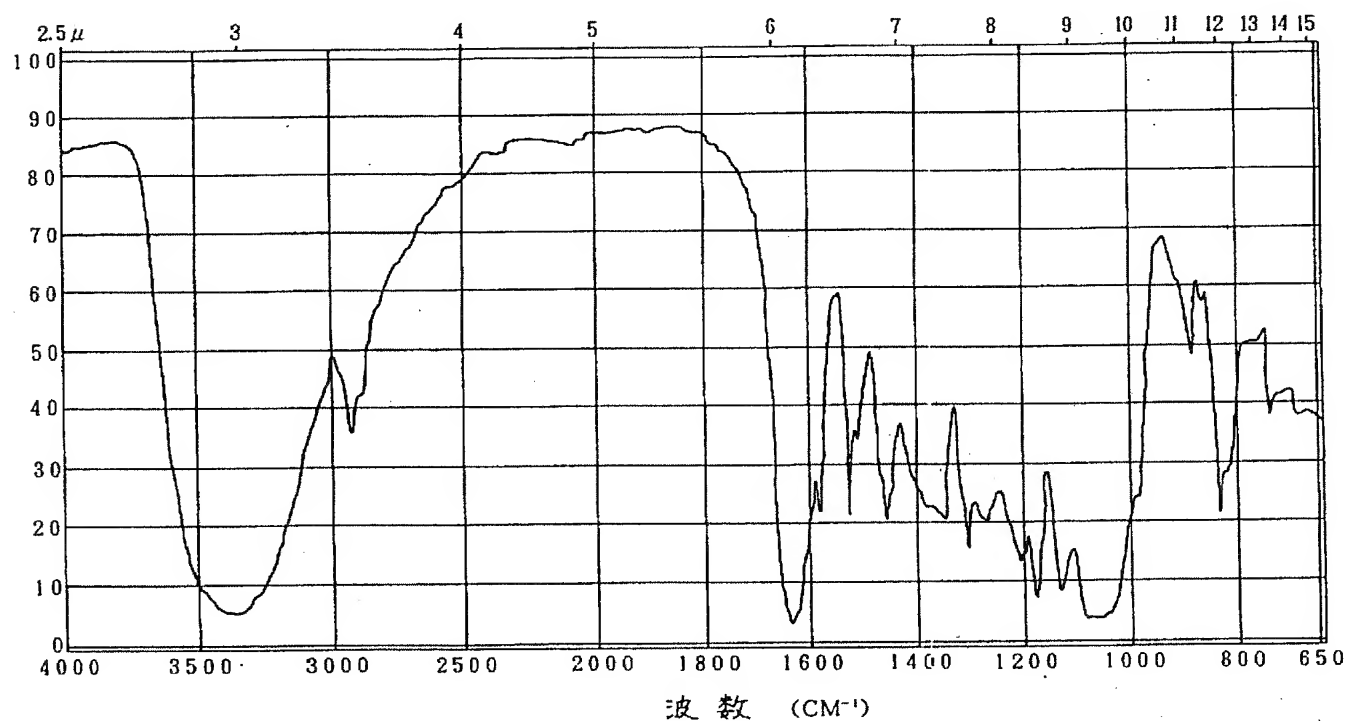


図面の浄書

第 1 図



第 2 図



手続補正書 (方式)

平成2年8月29日

特許庁長官 植 松 敏 殿



1 事件の表示

平成2年特許願第112665号

2 発明の名称

α-グリコシル ナリンジンとその製造方法  
並びに用途

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原



4 補正命令の日付 (発送日)

平成2年7月31日

5 補正の対象

図 面

方式  
落



6 補正の内容

図面を、別紙の通り補正します。